Uniwersytet Wrocławski

Wydział Biotechnologii
Zakład Inżynierii Białka

ul. F. Joliot-Curie 14a
50-383 Wrocław
tel. +48 71 375 28 24
fax +48 71 375 26 08
www.biotech.uni.wroc.pl

Wrocław, 6 września 2018 r.

Ocena pracy doktorskiej mgr Sylwii Krzanik zatytułowanej:

„*Small-molecule inhibitors of protein-protein interactions in the anticancer therapy*"

Wiodącym obecnie nurtem poszukiwania leków przeciwnowotworowych jest specyficzne blokowanie oddziaływań makrocząsteczek, zwykle typu białko-białko, z zastosowaniem bądź przeciwciał, bądź związków niskocząsteczkowych. W szczególności, rozdysocjowanie niektórych ze znanych i kluczowych dla funkcjonowania komórki rakowej oddziaływań okazało się skuteczną metodą terapii przeciwnowotworowej.

Praca doktorska mgr Krzanik dotyczy charakterystyki biologicznej związków niskocząsteczkowych odpowiadających za blokowanie tworzenia trzech typów kompleksów białkowych, istotnych dla procesu nowotworzenia. Pierwszy z kompleksów to oddziaływanie MdmX z p53, które prowadzi do obniżenia poziomu p53, a rozdysocjowanie kompleksu obu białek jest powszechnie uważane za jedną z najbardziej obiecujących metod terapii przeciwnowotworowej. Z kolei kompleks białek PD-1 i PD-L1 odpowiada za zahamowanie proliferacji limfocytów T, wydzielanie cytokin oraz funkcję cytotoksycznych limfocytów, a jego zablokowanie z użyciem przeciwciał stanowi skuteczną metodę leczenia nowotworów. Trzecim obiektem badań jest proteaza cysteinowa USP2, która jest enzymem deubikwitynującym, zdolnym do "ratowania" białek, w tym białek Mdm2 i MdmX oraz cykliny D1, przeznaczonych do degradacji w proteasomie. W tym przypadku chodzi raczej o hamowanie tego enzymu, a nie dysocjację kompleksu z innym białkiem. Praca doktorska dotyczy więc ważnego i aktualnego zagadnienia poszukiwania antagonistów oddziaływania białko-białko, celem zastosowania ich w charakterze środków terapeutycznych.

Praca doktorska mgr Krzanik to napisany po angielsku maszynopis liczący 104 strony, o strukturze typowej dla prac doktorskich i publikacji z obszaru nauk eksperymentalnych (Streszczenie, *Research project objectives, Introduction, Materials and methods, Results and discussion, Conclusions and perspectives, Literature references*). Rozprawa napisana jest

dobrą angielszczyzną, zredagowana i zilustrowana jest starannie, a ilość zauważonych przeze mnie błędów jest bardzo niewielka.

Miałem problem z oceną, jaki zakres badań wykonała doktorantka w ramach tej rozprawy. W Streszczeniu stwierdza ona, że „Celem pracy było potwierdzenie skuteczności inhibitorów oddziaływania białko-białko na poziomie komórkowym". Podobnie w rozdziale *Conclusions and perspectives* doktorantka podsumowuje wyniki doświadczeń komórkowych. Jednak na samym początku rozdziału *Results and discussion* (str. 57-59), a także na stronach 62-65 i 75-77 zestawia ona dane o inhibitorach oddziaływania p53-Mdm2 bez podania np. w zamieszczonych tabelach, kto zsyntetyzował i zmierzył stałe inhibicji dla tych związków. Prosiłbym o wytłumaczenie tych niejasności w czasie publicznej obrony.

Jak przypuszczam, oryginalne wyniki doktorantki związane są z przeprowadzeniem testów komórkowych uzyskanych wcześniej związków, w celu zanalizowania ich potencjału biologicznego. W takiej sytuacji myślę, że rozdział *Introduction* powinien zawierać mniej szczegółowych informacji o inhibitorach oddziaływania p53-Mdm2 (str. 21-35), które stanowią niemal połowę całego rozdziału. Pozostałe części tego rozdziału zestawiają informacje cyklu komórkowym oraz o badanych białkach (p53, Mdm2, USP2, PD-1 i PD-L1 oraz ich roli w procesie nowotworzenia, i są jak najbardziej prawidłowo dobrane.

Rozdział *Results and discussion* rozprawy doktorskiej zawiera wyniki uzyskane w trakcie realizacji pracy doktorskiej. Doktorantka w pracy stosowała testy Western blot, MTT oraz cytometrię przepływową. Do dwóch najważniejszych osiągnięć doktoratu zaliczam:

1. Pokazanie z użyciem linii komórkowych U2 OS, HCT116, MCF-7 i Saos-2, że pięć z badanych inhibitorów opartych na rdzeniu imidazolowym, posiada potencjał terapeutyczny i zdolnych jest do aktywowania białka p53 oraz zahamowania wzrostu komórek w zakresie stężeń mikromolowych. Związki te wydatnie skracały fazę S i wydłużały fazę G1/S lub G2/M.
2. Stosując linie komórkowe HCT116 i MCF-7 doktorantka ustaliła, że dwa inhibitory proteazy USP2, STD1 i STD1T, zdolne są do zahamowania ich wzrostu w zakresie stężeń mikromolowycvh, co skorelowane było w przypadku STD1T ze spadkiem poziomu cykliny D1, która jest substratem tej proteazy.

Potwierdzenie aktywności wybranych inhibitorów w testach biologicznych jest istotnym osiągnięciem i stanowi punkt wyjścia do dalszego poszukiwania związków o potencjale terapeutycznym. Niestety, badania inhibitorów oddziaływania PD-1 – PD-L1 z zastosowaniem cytometrii przepływowej, określenia poziomu apoptozy i proliferacji limfocytów T (CD4+ i CD8+) nie przyniosły wiarygodnych wyników.

W pracy doktorskiej mgr Krzanik zastosowała szereg, wspomnianych powyżej, technik biologii molekularnej i biologii komórki oraz biochemii. Opis inhibitorów oddziaływania p53 – Mdm2 świadczy o znajomości także biologii strukturalnej.

Podsumowując, moja ocena przedłożonej do recenzji pracy doktorskiej mgr Sylwii Krzanik zatytułowanej: „*Small-molecule inhibitors of protein-protein interactions in the anticancer therapy*" jest pozytywna, a rozprawa spełnia warunki ujęte stosownymi przepisami, zawartymi w art. 13 *ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym* z 2003 r. Wnoszę o dopuszczenie przez Wysoką Radę Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego mgr Krzanik do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jacek Otlewski